



Study of cell penetrating peptides as drug delivery systems for chemotherapeutic drugs and their anticancer properties

Filipa Dias de Oliveira

Mestrado em Bioquímica
Bioquímica Médica

Documento Público

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Francisco Pinto
Professora Doutora Ana Salomé Veiga

RESUMO

O cancro é uma doença que se caracteriza pelo crescimento e proliferação descontrolados de células mutadas e constitui uma das principais causas de morte em todo o mundo. O cancro da mama é o mais comum entre o sexo feminino e constitui a principal causa de morte associada ao cancro em mulheres de regiões menos desenvolvidas.

Atualmente os procedimentos mais comuns no tratamento do cancro incluem cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. No entanto, tanto a radioterapia como a quimioterapia podem causar danos em células e tecidos saudáveis dando origem a um conjunto de efeitos secundários. Adicionalmente, as células de cancro podem também desenvolver resistência aos compostos usados na quimioterapia. Assim, um dos focos da investigação científica na área de combate ao cancro passa pelo desenvolvimento de novos compostos que possam permitir ultrapassar os problemas associados às terapias convencionais.

Desde que foi demonstrado que a linfa de alguns insetos, os grânulos de neutrófilos humanos e a pele de sapos continham péptidos capazes de destruir culturas de bactérias, um novo tipo de agentes antimicrobianos tem sido explorado: os péptidos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs são péptidos bioativos, que têm entre 11 a 50 resíduos de aminoácidos e possuem carga global positiva, devido à elevada quantidade de resíduos de argininas e lisinas. Estes péptidos podem ser encontrados em microrganismos, plantas e animais, onde atuam como mecanismos de defesa. Neste sentido, os AMPs têm sido explorados como péptidos bioativos no combate a infeções por bactérias, fungos e vírus. O seu mecanismo de ação passa, de uma forma geral, pela disrupção da membrana celular das bactérias, que apresenta um carácter aniónico, o que promove uma interação electrostática com os péptidos catiónicos. Nos últimos anos tem sido proposto que os AMPs podem também ser ativos contra células de cancro, dada a natureza aniónica das membranas destas células, constituindo assim uma alternativa ao desenvolvimento de novos compostos anticancro. Assim, um AMP que apresente atividade anticancro pode também ser classificado como péptido anticancro (ACP). Os ACPs são péptidos catiónicos que têm normalmente menos de 40 resíduos de aminoácidos e apresentam propriedades hidrófobas e catiónicas. A carga global positiva destes péptidos deve-se ao elevado conteúdo em argininas e lisinas. Outra abordagem com vista ao desenvolvimento de novos compostos com atividade contra células de cancro é a otimização de agentes quimioterapêuticos conhecidos. Com base no sucesso terapêutico da cisplatina, um complexo metálico de platina usado no tratamento do cancro, vários complexos com diferentes centros metálicos e ligandos têm sido estudados contra células de cancro. Neste sentido, os complexos de ruténio têm recebido especial atenção uma vez que apresentam menor toxicidade quando comparados com os complexos de platina.

Os péptidos translocadores de membranas celulares (CPPs) são péptidos bioativos em membranas com uma composição que varia entre 5 a 30 resíduos de aminoácidos e apresentam um carácter catiónico devido ao elevado conteúdo de resíduos de argininas e lisinas. Estes péptidos apresentam também características anfipáticas e a capacidade de translocar membranas celulares. Devido a esta capacidade, estes péptidos têm sido aplicados como sistemas de direcionamento de fármacos (DDS), pelo que podem também ser usados na otimização de agentes quimioterapêuticos. A partilha de características estruturais entre AMPs, CPPs e ACPs explica o fato de haver uma relação recíproca entre estas classes de péptidos, uma vez que a ação dos mesmos pressupõe uma primeira interação eletrostática com as membranas celulares, que pode resultar na disrupção membranar ou na translocação da membrana com ação em alvos intracelulares.

Neste trabalho de investigação o objetivo foi estudar a atividade anticancro e o modo de ação de um complexo organometálico de ruténio (TM281), assim como dos conjugados que resultam da ligação deste complexo com diferentes péptidos. Esta ligação tem como objetivo promover a

internalização do complexo metálico pelas células de cancro, pelo que os péptidos selecionados para ligação ao complexo foram a Tat, pepR, pepM, vCPP 2319 e CrotB que apresentam atividade de CPPs.

Numa primeira fase, averiguou-se a atividade do complexo e conjugados contra uma linha de células epiteliais de cancro da mama designada MDA-MB-231, através da determinação dos valores de concentração responsável por 50% de morte celular (IC_{50}). Os resultados obtidos mostram que todos os compostos testados possuem atividade contra as células de cancro MDA-MB-231. No entanto, os conjugados revelaram uma atividade mais elevada quando comparados com o complexo organometálico. Com base nos resultados obtidos foram identificados dois dos conjugados mais ativos, o TM295 e o TM298, com valores de IC_{50} de 2.42 e 2.70 μ M, respetivamente. De modo a completar o estudo, foi testada a atividade anticancro dos péptidos que fazem parte destes conjugados, pepR e vCPP 2319. Os valores de IC_{50} obtidos foram de 2.55 e 5.21 μ M, para o pepR e vCPP 2319, respetivamente, o que mostra que estes péptidos também possuem atividade contra as células de cancro MDA-MB-231. Assim, foi possível concluir que a conjugação do complexo de ruténio com os péptidos pepR e vCPP 2319 resulta em conjugados cuja atividade citotóxica se deve principalmente ao efeito do péptido.

Para estudar se a atividade citotóxica do complexo organometálico, dos conjugados TM295 e TM298 e dos péptidos pepR e vCPP 2319 é seletiva para células de cancro, a atividade destes compostos foi testada contra uma linha de células de mama saudáveis. As células saudáveis escolhidas para este estudo são células epiteliais da glândula mamária designadas por MCF 10A. Através da análise dos valores de IC_{50} obtidos para células de cancro e saudáveis foi possível concluir que todos os compostos atuam preferencialmente em células de cancro.

Após avaliação da atividade dos compostos contra células de cancro e saudáveis, realizaram-se estudos sobre o seu mecanismo de ação. De modo a perceber se o mecanismo de ação dos compostos passaria pela ação ao nível na membrana, recorreu-se à técnica de potencial zeta. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos compostos estudados promove alterações significativas na carga superficial de células de cancro ou saudáveis, o que é indicativo que os compostos não ficam retidos na membrana celular e o seu alvo preferencial deve ser intracelular. Assim, recorreu-se à técnica de microscopia de força atómica (AFM), de modo a avaliar o efeito dos compostos na morfologia das células. Nas imagens de altura, erro e projeções tridimensionais (3D) obtidas para as células MDA-MB-231 na presença dos compostos, foi possível observar contração celular, colapso e condensação nuclear e membrana celular intacta. Na presença dos péptidos, foi ainda possível observar fragmentos nucleares nas células de cancro, que poderão constituir corpos apoptóticos. Assim, os resultados obtidos sugerem que os compostos atuam nas células de cancro num alvo intracelular e poderão induzir morte celular por apoptose. Relativamente aos resultados obtidos para as células saudáveis, na presença do complexo organometálico, foi possível observar contração celular, colapso e desorganização nuclear e membrana celular intacta. Na presença do conjugado TM295 e dos péptidos pepR e vCPP 2319 foi possível observar estruturas proeminentes que poderão resultar da fusão dos nucléolos. Na presença dos péptidos foi ainda possível observar contração celular. Estas observações sugerem ação num alvo intracelular e morte celular por apoptose, tal como descrito para as células de cancro. Na presença do conjugado TM298 foi possível constatar a total destruição celular. Os péptidos exibiram um efeito menos agressivo do que os conjugados, uma vez que foi observado um menor grau de destruição celular. A partir das imagens de altura foi possível obter parâmetros, como o perfil de altura das células e a rugosidade da membrana celular. O efeito dos compostos nos perfis de altura das células de cancro revelou-se em concordância com a interpretação das imagens obtidas por AFM, observando-se uma diminuição da altura da célula no caso de colapso nuclear e variações abruptas da altura das células no caso de contração celular. Relativamente às células MCF 10A, perfis de altura irregulares estão em concordância com o elevado grau de destruição celular provocado pelos

conjugados. Neste caso, os picos observados que se destacam do restante perfil estão de acordo com as estruturas proeminentes observadas na presença dos péptidos. A análise do efeito na altura máxima das células e na rugosidade da membrana celular apenas foi possível para o TM281 em células de cancro e saudáveis e para o vCPP 2319 em células de cancro. Esta análise acabou por revelar a inexistência de diferenças significativas nestes parâmetros. No entanto, a ausência de uma diminuição significativa da rugosidade da membrana celular na presença do complexo organometálico e do vCPP 2319 pode indicar que o citoesqueleto mantém a sua função de suporte da bicamada lipídica.

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que os conjugados que resultam da ligação dos péptidos ao complexo organometálico de ruténio TM281 apresentam uma elevada atividade anticancro, que supera a atividade do próprio complexo. Em dois dos conjugados mais ativos, TM295 e TM298, os péptidos que os constituem, pepR e vCPP 2319, respetivamente, são os responsáveis pela atividade anticancro. Assim, foi possível concluir que estes péptidos podem não só funcionar como parte integrante dos conjugados, mas também servir de base para uma nova linha de investigação do campo do desenvolvimento de novos ACPs.

Palavras-Chave: Péptidos Anticancro; Ruténio; Viabilidade Celular; Potencial Zeta; Microscopia de Força Atómica.